

HBV 基因型与耐药变异的关系

蒋孝华¹, 李小芬¹, 蔡亚平², 李红梅¹

(1 南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001; 2 南华大学流行病学教研室, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] **目的** 探讨乙型肝炎病毒(HBV)基因型与核苷(酸)类似物耐药变异的关系。**方法** 湖南省衡阳地区 122 例慢性乙型肝炎患者接受拉米夫定治疗(100 mg/d)48~96 周, 发生耐药变异者改用阿德福韦酯治疗(10 mg/d)96 周。采用直接测序法进行 HBV 基因分型, 同时检测拉米夫定、阿德福韦酯和恩替卡韦耐药变异位点。**结果** 122 例慢性乙型肝炎患者中, B 基因型 86 例(70.49%), C 基因型 24 例(19.67%), 未分型 12 例(9.84%)。42 例检出拉米夫定变异株, 其中 B 基因型 32 例, C 基因型 10 例, B、C 基因型拉米夫定耐药变异率分别为 37.21%(32/86)和 41.67%(10/24), 差异无显著性($\chi^2 = 0.16, P = 0.69$); 42 例经阿德福韦酯治疗 48 周和 96 周的变异发生率分别为 0.00%(0/42)和 2.38%(1/42), B、C 基因型阿德福韦酯耐药变异率分别为 3.13%(1/32)和 0.00%(0/10)。拉米夫定耐药变异类型主要为 rtM204V + rtL180M(35.71%)和 rtM204I(38.10%); B、C 基因型比较, 拉米夫定耐药变异类型差异无显著性($\chi^2 = 17.44, P = 0.23$)。**结论** 湖南省衡阳地区 HBV 基因型以 B 型为主, C 型次之; HBV 基因型对拉米夫定耐药变异发生率及变异类型无明显影响。

[关键词] 肝炎病毒, 乙型; 基因型; 抗药性, 微生物; 耐药变异

[中图分类号] R512.6⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2009)03-0160-04

Relationship between HBV genotypes and drug-resistance mutations

JIANG Xiao-hua¹, LI Xiao-fen¹, CAI Ya-ping², LI Hong-mei¹ (1 The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China; 2 Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[Abstract] **Objective** To study the relationship between HBV genotypes and nucleotide analogues drug-resistance mutations. **Methods** One hundred and twenty-two patients with chronic hepatitis B were treated with lamivudine 100mg/d for 48~96 weeks, patients who developed lamivudine-resistance mutations used adefovir dipivoxil 10mg/d for 96 weeks instead of lamivudine. HBV genotypes, lamivudine, adefovir dipivoxil and entecavir resistance mutations were determined by DNA sequencing. **Results** Among 122 cases, 86 (70.49%) were genotype B, 24 (19.67%) were genotype C, and 12(9.84%) were not classified. 42 lamivudine-resistance mutants (32 mutants of genotype B, and 10 mutants of genotype C) were found in 122 cases. The incidence of mutations was 37.21%(32/86) and 41.67%(10/24) in HBV genotypes B and C, respectively, there was no significant difference between the two ($\chi^2 = 0.16, P = 0.69$). The incidence of mutations was 0.00%(0/42) and 2.38%(1/42) in 42 patients treated with adefovir dipivoxil for 48 and 96 weeks, respectively, the incidence of adefovir dipivoxil mutations was 3.13%(1/32) and 0.00%(0/10) in genotypes B and C, respectively. The main types of lamivudine-resistance mutations were rtM204V + rtL180M(35.71%) and rtM204I(38.10%); Lamivudine-resistance mutation types showed no significant difference between HBV genotypes B and C($\chi^2 = 17.44, P = 0.23$). **Conclusion** HBV genotype B is the most prevalent, and genotype C is the second in Hengyang of Hunan. HBV genotypes have no obvious influence on the incidences and types of mutation during lamivudine therapy.

[Key words] hepatitis B virus; genotype; drug-resistance, microbial; drug-resistance mutation

[Chin Infect Control, 2009, 8(3): 160-163]

[收稿日期] 2008-09-20

[基金项目] 湖南省自然科学基金联合基金项目(07JJ6165)

[作者简介] 蒋孝华(1965-), 女(汉族), 湖南省衡阳市人, 副教授, 主要从事病毒性肝炎基础和临床研究。

[通讯作者] 蒋孝华 E-mail: snakewin65@yahoo.com.cn

乙型肝炎病毒(HBV)感染是严重的公共卫生问题,全球约 20 亿人感染过 HBV,慢性 HBV 感染者达 3.5 亿;全球每年约 100 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝癌^[1]。根据 HBV 全基因序列差异 $\geq 8\%$ 或 S 区基因序列差异 $\geq 4\%$,HBV 基因型分为 A~H 8 种。拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定是核苷(酸)类抗 HBV 药物,在临床上被广泛使用,但长期治疗而发生的病毒耐药是此类药物面临的共同问题。近年来发现 HBV 基因型与乙型肝炎疾病进展、转归有一定的关系^[2],但 HBV 基因型对核苷(酸)类似物疗效及耐药变异的影响尚不明确。本研究采用聚合酶链反应(PCR)-DNA 直接测序法对湖南省衡阳地区 122 例慢性乙型肝炎患者进行 HBV 基因分型,同时检测拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦耐药变异位点,调查湖南省衡阳地区 HBV 基因型分布,探讨 HBV 基因型与核苷(酸)类似物抗病毒治疗中发生耐药变异的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料 122 例慢性乙型肝炎患者为本院 2003 年 5 月—2008 年 5 月间门诊就诊和住院的患者,男性 103 例,女性 19 例;年龄 17~64 岁,平均(32.63 \pm 9.56)岁。诊断均符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标准^[3],且 HBV DNA $\geq 10^5$ 拷贝/mL,血清丙氨酸转氨酶(ALT) ≥ 80 U/L,甲型、丙型、戊型、庚型肝炎病毒及人免疫缺陷病毒抗体阴性。所有患者口服拉米夫定 100 mg/d,疗程 48~96 周,发生耐药变异后使用阿德福韦酯 10 mg/d 与拉米夫定 100 mg/d,联用 8 周后,停用拉米

夫定,口服阿德福韦酯 10 mg/d,疗程 96 周,未用过其他抗病毒药物。拉米夫定耐药的定义为:与治疗期间最低点相比,血清 HBV DNA 水平升高 >1 lg,并经测序分析证实。采集外周血 -70 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2 肝脏生化指标检测 采用日立 BM717 型全自动生化分析仪检测 ALT。

1.3 HBV 血清标志物检测 乙型肝炎表面抗原、抗体(HBsAg、抗 HBs)、乙型肝炎 e 抗原、抗体(HBeAg、抗 HBe)、乙型肝炎核心抗体(抗 HBc)检测采用酶联免疫吸附试验(ELISA),试剂购自北京万泰生物公司。

1.4 HBV DNA 定量检测 采用荧光定量 PCR 法检测,试剂购自上海申友公司,所用仪器为美国 MJ OPTICON 2 PCR 仪。

1.5 HBV 耐药突变及基因分型 采用 PCR-DNA 测序法,能同时检测拉米夫定、阿德福韦酯及恩替卡韦特异突变位点,并能确定 HBV 基因型。测序由上海申友公司完成。

1.6 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件统计,组间均数比较采用 *t* 检验,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 慢性乙型肝炎患者基线特征和基因型分布 122 例慢性乙型肝炎患者中,HBV 基因型 B 者 86 例(70.49%),基因型 C 者 24 例(19.67%),未分型 12 例(9.84%)。不同 HBV 基因型患者的年龄、性别、HBeAg 阳性数、ALT 水平、血清 HBV DNA 基线值的差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。

表 1 122 例慢性乙型肝炎患者基线特征及 HBV 基因型分布

Table 1 Baseline characteristics and HBV genotype distribution in 122 patients with chronic hepatitis B

	HBV			合计
	基因型 B	基因型 C	未分型	
例数	86	24	12	122
年龄(岁)	31.80 \pm 8.89	35.71 \pm 9.11	32.42 \pm 13.97	32.63 \pm 9.56
男/女(例)	75/11	18/6	10/2	103/19
HBeAg 阳性(例)	66	19	9	94
血清 HBV DNA(lg 拷贝/mL)	7.37 \pm 1.06	7.37 \pm 0.98	6.98 \pm 1.07	7.33 \pm 1.05
ALT(U/L)	199.85 \pm 97.93	200.79 \pm 72.74	177.00 \pm 61.52	197.79 \pm 90.19

HBV 基因型 B 者与基因型 C 者比较,年龄、血清 HBV DNA、ALT 水平的 *t* 值分别为 1.89、0.01、0.04,*P* 值分别为 0.06、1.00、0.97;男/女及 HBeAg 阳性数的 χ^2 值分别为 2.14、0.06,*P* 值分别为 0.14、0.80

2.2 HBV 的 B、C 基因型与核苷(酸)类似物耐药

变异率的关系 122 例慢性乙型肝炎患者应用拉米

夫定治疗 96 周,共 42 例检出变异株,其中 B 基因型 32 例,C 基因型 10 例,总变异率为 34.43%;48 周和 96 周变异发生率分别为 9.84%(12/122)、34.43%(42/122),B、C 基因型拉米夫定耐药变异发生率分别为 37.21%(32/86)、41.67%(10/24),差异无显著性($\chi^2 = 0.16, P = 0.69$)。42 例拉米夫定耐药者经阿德福韦酯治疗 96 周,检出 1 例 B 基因型患者 rtN236T 变异;48 周和 96 周阿德福韦酯耐药变异率分别为 0.00%(0/42)和 2.38%(1/42),B、C 基因型阿德福韦酯耐药变异率分别为 3.13%(1/32)和 0.00%(0/10),由于阿德福韦酯耐药变异病例数少,未做统计学分析。

2.3 HBV 的 B、C 基因型与拉米夫定耐药变异类型的关系 见表 2。拉米夫定耐药变异类型共 7 种,除 rtM204V + rtL180M、rtM204I、rtM204I + rtL180M、rtM204V + rtM204I + rtL180M 4 种类型外,C 基因型有 1 例患者在经过拉米夫定治疗后,未用阿德福韦酯治疗的情况下发生 rtL180M + rtA181V 变异,B、C 基因型各有 1 例在经过拉米夫定治疗后,未用恩替卡韦治疗情况下发生与恩替卡韦耐药有关的 rtM204I + rtM250V、rtM204I + rtT184S 位点变异,B、C 基因型拉米夫定耐药变异类型差异无显著性($\chi^2 = 17.44, P = 0.23$)。

表 2 HBV B、C 基因型与拉米夫定耐药变异类型的关系(例,%)

Table 2 Relationship between HBV lamivudine-resistance mutation types and genotypes B、C (case, %)

HBV 基因型	例数	rtM204V + rtL180M	rtM204I	rtM204I + rtL180M	rtM204V + rtM204I + rtL180M	rtL180M + rtA181V	rtM204I + rtM250V	rtM204I + rtT184S
B	32	13(40.63)	13(40.63)	3(9.38)	2(6.25)	0(0.00)	1(3.13)	0(0.00)
C	10	2(20.00)	3(30.00)	2(20.00)	1(10.00)	1(10.00)	0(0.00)	1(10.00)
合计	42	15(35.71)	16(38.10)	5(11.90)	3(7.14)	1(2.38)	1(2.38)	1(2.38)

3 讨论

基因型是指根据不同个体基因序列之间的规律性差异而分成的不同类型。HBV 基因型呈一定的地理区域性分布,B 和 C 基因型主要分布在东亚和东南亚。本研究表明,本地区 HBV 优势基因型为 B 基因型(占 70.49%),其次为 C 基因型(占 19.67%),与以往的报道^[4]一致。

拉米夫定长期治疗出现耐药突变,是由于部分患者 HBV 多聚酶基因变异,主要是酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)变异所致;长期应用阿德福韦酯出现耐药突变,主要是在 HBV 多聚酶 D 区 N236T 和 B 区 A181V 发生耐药突变。近几年来,HBV 基因型与核苷(酸)类似物疗效及耐药突变相关性的研究报道不一。Moskovitz 等^[5]报道,HBV 各基因型之间对拉米夫定治疗的生化学或病毒学应答没有显著差别。李迪等^[6]报道,中国北方地区 HBV B 与 C 基因型之间 YMDD 突变发生率差异无显著性,但 YMDD 变异类型在 B 与 C 基因型之间差异有显著性。然而,Kobayashi 等^[7]报道,HBV 基因型有助于预测慢性乙型肝炎患者对拉

米夫定长期治疗的应答和 YMDD 变异的产生。王义光等^[8]报道,HBV 各基因型发生 YMDD 变异率差异较大,C 基因型 YMDD 突变率高于 A 基因型和 B 基因型。对于不同 HBV 基因型慢性乙型肝炎患者对阿德福韦酯治疗的应答以及耐药突变相关性的研究,目前报道甚少。本研究表明,HBV B、C 基因型对拉米夫定耐药变异发生率分别为 37.21%和 41.67%,差异无显著性($P > 0.05$),而且拉米夫定耐药变异类型差异亦无显著性($P > 0.05$)。本研究经直接测序检出的 42 例拉米夫定基因耐药患者,均出现了 HBV DNA 突破,且有 28 例 B 基因型和 8 例 C 基因型患者 ALT 水平升高,即出现了临床耐药(指出现病毒学突破和 ALT 水平高于正常值上限),但有 4 例 B 基因型和 2 例 C 基因型患者 ALT 水平尚在正常范围内,即未出现临床耐药;B、C 基因型拉米夫定临床耐药变异发生率分别为 32.56%、33.33%,差异无显著性($P > 0.05$)。HBV B、C 基因型阿德福韦酯耐药变异率分别为 3.13%和 0.00%。经测序检出的 1 例阿德福韦酯 rtN236T 变异患者同时有 HBV DNA 反跳且 ALT 水平高于正常值,由于突变病例数少,未做统计学分析。因此,本研究结果尚需要多中心和扩大样本量进一步

验证。本研究显示,42 例拉米夫定耐药患者经阿德福韦酯治疗,48 周末发现变异,96 周仅 1 例 B 基因型患者出现 rtN236T 变异,变异发生率为 2.38%,比拉米夫定治疗低,表明阿德福韦酯是拉米夫定耐药患者良好的选择。

近年研究表明,HBV 耐药突变日趋复杂,已远非 YMDD 变异所能涵盖。本研究发现 HBV 耐药变异类型多样,1 例 C 基因型患者在服用拉米夫定 1 年,未服用阿德福韦酯的情况下,检测出 rtL180M + rtA181V 变异,提示拉米夫定耐药突变也可发生在 rtA181V 位点,而此位点与阿德福韦有交叉耐药。1 例 B 基因型患者和 1 例 C 基因型患者在服用拉米夫定 2 年,未服用恩替卡韦的情况下分别检测出 rtM204I + rtM250V 和 rtM204I + rtT184S 位点的变异,在反转录酶区的 250 和 184 位点发生氨基酸的置换变异,认为与发生恩替卡韦耐药有关,提示对拉米夫定耐药后,有可能自发形成对恩替卡韦耐药,使后续使用恩替卡韦的疗效下降。因此,在应用核苷(酸)类似物抗病毒治疗过程中,定期进行多位点耐药变异检测有助于更好地选择抗病毒药物,预测抗病毒治疗的疗效。

[参 考 文 献]

- [1] Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures[J]. *J Viral Hepat*, 2004, 11(2):97-107.
- [2] Sumi H, Yokosuka O, Seki N, *et al*. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease [J]. *Hepatology*, 2003, 37(1):19-26.
- [3] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(6):324-329.
- [4] 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 湖南省乙肝病毒基因型分布及临床意义[J]. *湖南医科大学学报*, 2002, 27(1):29-31.
- [5] Moskovitz D N, Osiowc C, Giles E, *et al*. Response to long-term lamivudine treatment (up to 5 years) in patients with severe chronic hepatitis B, role of genotype and drug resistance [J]. *J Viral Hepat*, 2005, 12(4):398-404.
- [6] Li D, Gu H X, Zhang S Y, *et al*. YMDD mutations and genotypes of hepatitis B virus in Northern China [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2006, 59(1):42-45.
- [7] Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, *et al*. Response to long-term lamivudine treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B, and C [J]. *J Med Virol*, 2006, 78(10):1276-1283.
- [8] 王义光, 朱武军, 杨兴林. 贵阳地区乙型肝炎病毒 YMDD 变异与基因分型[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(3):193-197.

(上接第 206 页)

3 讨论

3.1 乙型肝炎防治工作任重道远 此次调查的报告中,病毒性肝炎共 199 例,其中乙型肝炎 182 例,占 91.46%,说明其防治工作的艰巨性。但儿童病例较少,与乙型肝炎疫苗接种率较高有关。国内报道^[1],普及接种乙型肝炎疫苗 10 年,儿童及青少年乙型肝炎表面抗原(HBsAg)携带率及乙型肝炎发病率已明显下降,原发性肝癌的发病率也有所下降。因此,为婴幼儿进行有效的疫苗接种对降低乙型肝炎的发病率极为重要,应充分意识到此项工作的必要性。

3.2 关注流动人口的传染病防治 传染病发病中,流动人口所占比率显著增加,分析其原因为:威海市经济较发达,近年来流动人口日益增多,由于流动人口的特殊性,其居住环境、经济条件相对较差,加上不良的卫生习惯,给传染病的发生、传播和流行创造了有利条件。儿童受环境因素的影响更为明显。此

外,因流动人口的流动性造成计划免疫无法顺利进行,疫苗不能按时接种,也使相关传染病的发病率上升。因此,应加强流动人口管理,关注其生存状态,提高防范意识,加强常规免疫接种,以降低传染病的发病率。

3.3 针对季节特点,做好传染病防治 某些传染病的发生有明显的季节性特点,如呼吸道传染病集中在冬春季,而夏季则为肠道传染病多发季节。因此,可针对其特点,采取相应措施。对免疫力低下的重点保护人群,如老年人及儿童,可于每年秋季接种流感疫苗,有针对性地防范。其次应加强肠道门诊管理,严格执行消毒隔离及各项制度,提高公众的传染病防范意识,充分调动全社会力量,最大限度减少传染病发生。

[参 考 文 献]

- [1] 宫道华, 吴升华. 小儿感染病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:634.